

MINISTERE DE LA JEUNESSE, L'EDUCATION NATIONALE
ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

EMMANUEL COLLEC

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

**RECHERCHE DES PARTENAIRES CYTOPLASMIQUES
DE LA GLYCOPROTEINE LUTHERAN.
ANALYSE DE L'INTERACTION AVEC LA PROTEINE UBC9**

Soutenu le 1^{er} Février 2005

Devant le jury suivant :

Dr Andras Paldi
Dr RENAUD-PAÏTRA
Pr Philippe ROUGER
Pr Caroline LE VAN KIM
Pr Bernard GRANDCHAMP

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Laboratoire EPHE de Génétique Moléculaire et Physiologique

Université de Versailles/Saint-Quentin, CNRS UPRES- A8087
Bâtiment Fermât, 45 avenue des Etats-Unis 78035 VERSAILLES Cedex
Directeur : Pr Bernard MIGNOTTE E-mail : mignotte@genetique.uvsq.fr

Institut National de la Transfusion Sanguine

Laboratoire de Biochimie et Génétique INSERM U76
6, rue Alexandre Cabanel 75015 PARIS
Directeur : Dr Jean-Pierre CARTRON E-mail : cartron@idf.inserm.fr

**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre**

RECHERCHE DES PARTENAIRES CYTOPLASMIQUES

**DE LA GLYCOPROTEINE LUTHERAN.
ANALYSE DE L'INTERACTION AVEC LA PROTEINE UBC9**

EMMANUEL COLLEC

Le 1^{er} Février 2005

RESUME

Les antigènes de groupe sanguin Luthéran (Lu) et l'antigène B-CAM (Basal-cell adhesion molecule) sont portés par deux glycoprotéines (gps) isoformes appelées Lu et Lu (v13) qui ne diffèrent que par la taille de leur domaine cytolasmique. Ces protéines appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, sont exprimées dans les globules rouges, dans les cellules épithéliales de nombreux tissus et notamment dans le rein, dans les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires et sont surexprimées dans certaines cellules cancéreuses. Ces glycoprotéines sont des molécules d'adhérence, récepteurs uniques de la laminine dans les globules rouges. Le domaine cytoplasmique de l'isoforme la plus longue Lu possède des sites consensus de phosphorylation et d'adressage membranaire. Il a de plus été montré que ce domaine est lié au squelette érythrocytaire.

Nous avons recherché des partenaires potentiels du domaine cytoplasmique de la gp Lu par la technique du double hybride dans la levure en criblant une banque d'ADNc de rein humain. Ce crible a permis d'isoler l'enzyme Ubc9 (Ubiquitin-conjugated-enzyme 9). Mon travail a consisté à: i) analyser l'interaction avec la gp Lu et cartographier son site de fixation sur la gp Lu; ii) confirmer cette interaction par des approches biochimiques. Dans ce but nous avons utilisé les techniques de capture GST " GST-pulldown " (*in vitro*) et de coimmunoprécipitation (*ex vivo*). Ces expériences ont été réalisées avec la gp Lu sauvage et ses différents mutants. Les résultats ont confirmé l'existence d'une interaction ionique entre Ubc9 et la gp Lu.

Nous avons ensuite déterminé l'effet de cette interaction pour préciser la localisation subcellulaire de la gp Lu. Par microscopie confocale on observe une localisation de la gp Lu majoritairement basolatérale dans les cellules MDCK polarisées. Par contre le mutant Lu, incapable de fixer Ubc9, présente une localisation diffuse au niveau apical et basal. Il semble donc que la protéine Ubc9 soit impliquée dans le transport cellulaire et l'encrage membranaire de la gp Lu.

MOTS-CLES : Glycoprotéine Lu / B-CAM, molécule d'adhérence, récepteur de la laminine, Ubc9, interaction ionique, localisation cellulaire.

ABREVIATIONS

I- INTRODUCTION 1

A- Généralités sur les groupes sanguins. 9

B- Le système de groupe sanguin Luthéran 10

B.1- Le polymorphisme Lu^a/Lu^b

10

B.2- Structure du gène LU humain	11
C- Les Glycoprotéines Luthéran (gps lu)	11
C.1- Clonage des gps Lu/B-CAM	11
C.2.- Structure des gps Lu/B-CAM	12
C.2.1- Les antigènes Lu sont portés par deux gps isoformes Lu et Lu (v13).	12
C.3 - Distribution tissulaire des gps Lu/B-CAM	13
C.4- Les gps Lu/B-CAM, molécules d'adhérence	13
C.4.1- Les molécules d'adhérence dans les érythrocytes.	14
C.4.2- Molécules d'adhérence dans les cellules mésangiales glomérulaires.	14
C.5- Les gps Lu/B-CAM récepteurs spécifiques de la laminine 10/11.	15
C.5.1- Site de fixation aux gps Lu/B-CAM	16
C.5.2- Site de fixation au niveau de la laminine	17
C.6- Gps Lu et voies de signalisation.	17
C.7- Interaction des gps Lu/B-CAM avec le squelette érythrocytaire	17

D- Objectifs du travail. 18

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES 24

A- METHODES GENERALES

A.1 Biologie moléculaire	Signet non défini.
A.1.2- Amplification par PCR	
A.1.3- Digestion par des enzymes de restriction	
A.1.4- Déphosphorylation	
A.1.5- Purification des ADN	
A.1.6- Ligation plasmide-insert.	
A.1.7- Transformation des bactéries compétentes DH5 a et XL10.	
A.1.8- Purification des plasmides recombinants.	
A.1.9- Mutagenèse dirigée	
A.1.10- Séquençage automatique d'ADN.	

A.2- Biochimie	Signet non défini.
A.2.1- Electrophorèse des protéines en gel SDS-polyacrylamide.	
A.2.2- Transfert sur membrane de nitrocellulose.	

A.3- Culture cellulaire	Signet non défini.
A.3.1- Les cellules	
A.3.2- Transfection de cellules adhérentes par la lipofectine	
A.3.3- Transfection de cellules adhérentes par électroporation	

B- LE SYSTEME DOUBLE HYBRIDE

B.1- Criblage de la Banque	Signet non défini.
B.1.2- Les Mutants	
B.1.3- La banque complémentaire de rein humain.	
B.2- Confirmation de la spécificité des interactions	Signet non défini.
B.2.1- La souche de levure	
B.2.2- Les milieux de culture.	
B.2.3- Le milieu complet ou YPDA	
B.2.4- Les milieux sélectifs	
B.2.5- Cotransformation dans la levure L40	

B.3- Test d'auxotrophie à l'histidine	Signet non défini.
--	--------------------

C- VALIDATION DE LA SPECIFICITE DES INTERACTIONS

C.1- Le système de fusion GST.

Signet non défini.

C.1.2- Expression et purification des protéines de fusion GST.

C.1.2.1- Production

C.1.2.2- Purification

C.2- Le système 6x-Histidine

Signet non défini.

C.2.1- Expression et purification d'Ubc9-6x-His

C.2.2.1.- Préparation d'Ubc9

C.2.2.2- Sous clonage d'Ubc9 dans PQE80

C.2.2.3- Production

C.2.2.4- Purification en conditions non dénaturantes

C.3 - Technique de capture GST

Signet non défini.

C.3.1- Interaction directe entre 6x-His-Ubc9 et GST Lu.

D- MICROSCOPIE CONFOCALE.

D.1- Immunofluorescence et microscopie confocale

Signet non défini.

III- RESULTATS 48

A- RECHERCHE DES PARTENAIRES DES GPS LU

A.1- Classement et identification des clones His+ LacZ+.

Signet non défini.

A.2- Localisation du site d'interaction de la protéine Ubc9 sur la gp Lu

Signet non défini.

A.2.1- Interaction avec l'Ankyrine G

A.2.2- Interaction avec Ubc9

A.2.2- Tests b-galactosidase en phase liquide

A.3- Conclusion

Signet non défini.

B- CONFIRMATION DE LA SPECIFICITE DES INTERACTIONS PAR DES APPROCHES BIOCHIMIQUES IN VITRO ET CELLULAIRE

B.1 Capture de GST : " GST-pull down "

Signet non défini.

B.1.1- Productions protéique des fusions GST

B.1.2- Interaction Ubc9 / Lu

B.2- Co-immunoprécipitation gp Lu/Ubc9.

65

C- ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GPS LU SAUVAGES ET MUTÉES EN MICROSCOPIE CONFOCALE. 70

IV- DISCUSSION

75

A- La protéine Ubc9

A.1- La protéine E2 - Ubiquitin-Conjugating Enzyme : Ubc9

Signet non défini.

A.2- Quel rôle pour Ubc9 dans l'expression membranaire de la gp Lu?

Signet non défini.

V- BIBLIOGRAPHIE

80

ABREVIATIONS

a.a.	Acide aminé
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Au	Auberger
B-CAM	Basal Cell Adhesion Molecule
C-TER	Position C-terminale
EGF	Epithelial Growth Factor
gp	Glycoprotéine
GR	Globule rouge
GST	Glutathion - S - Transferase
Ig-like	Immunoglobulin-like
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
pb	Paires de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
LB	Milieu de Luria Bertani
LL	Di leucine
Lu	Luthéran
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MEC	Matrice extracellulaire
N-TER	Position N-terminale
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Protéine Kinase A
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFIg	Superfamille des Immunoglobulines
SH3	Src Homology -3
TBS	Tris borate EDTA
TRIS	Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane
Ubc9	Ubiquitin Conjugated Enzyme 9
YPDA	Yeast Peptone Dextrose adénine sulfate

I- INTRODUCTION

A- Généralités sur les groupes sanguins.

Les antigènes de groupes sanguins sont des structures polymorphes portées par des protéines, lipides, glycolipides de la membrane des globules rouges (dont les déterminants sont de nature glucidique ou protéique) (Mudad and Telen 1996; Daniels 1997; Cartron and Colin 2001). La plupart de ces antigènes est aussi exprimée dans de nombreux tissus de l'organisme. Par exemple des études récentes suggèrent que la protéine Kell qui a longtemps été considérée comme restreinte aux globules rouges, a une large distribution tissulaire notamment dans les organes lymphoïdes, les testicules et le cerveau (Russo et al. 2000; Camara-Clayette, Rahuel et al. 2001). Cependant, certains systèmes sont spécifiquement érythroïdes, tels que RH, MNS, LW et ERMAP. Les antigènes ABO, Hh, Lewis, Sese sont définis par des structures glucidiques et sont les produits indirects des gènes de groupes sanguins. En effet, ils résultent de l'addition de motifs glucidiques sur des protéines ou des lipides, catalysée par des glycosyltransférases présentes dans l'appareil de Golgi (produits directs de ces gènes) (Cartron et al. 1998). Au contraire, les antigènes de nature polypeptidique sont les produits directs des gènes.

La base moléculaire des 29 systèmes de groupes sanguins connus est bien définie par la Société Internationale de la Transfusion Sanguine. La bonne connaissance de leurs polymorphismes au niveau de l'ADN a permis l'élaboration de nouvelles méthodes de génotypage par PCR (Cartron and Colin 2001).

En comparant les informations apportées par les banques de données sur les homologues de structures avec d'autres protéines, sur la prédiction des structures secondaires, et sur la détermination des fonctions de certaines molécules, les antigènes de groupes sanguins ont été classés schématiquement en cinq familles fonctionnelles:

- Les transporteurs et canaux ;
- Les récepteurs de ligands exogènes, virus, bactéries et parasites ;
- Les molécules d'adhérence;
- Les enzymes ;
- Les protéines structurales.

Il faut préciser que cette classification est arbitraire car certaines molécules peuvent avoir des

propriétés communes à plusieurs catégories. Par exemple, la Bande 3 porteuse des antigènes Diego est à la fois responsable de la fonction de transporteur d'anions et du maintien de la structure du globule rouge à travers son interaction avec des protéines du squelette érythrocytaire comme l'ankyrine (Palek et Lambert 1990).

B- Le système de groupe sanguin Luthéran

Le système de groupe sanguin Luthéran comprend en 19 antigènes LU1 à LU21 sérologiquement définis (Crew, et al 2004), (LU10 et LU15 sont déclarés obsolètes). Quatre paires d'antigènes sont antithétiques (ex: toutes hématies Lu^a négative est nécessairement Lu^b et inversement), **Lu^a (LU1) et Lu^b (LU2)**; Lu6 et Lu9; Lu8 et Lu14; et AU^a (LU18) et AU^b (LU19).

B.1- Le polymorphisme Lu^a/Lu^b

On doit la découverte du système Lu à Callender et son équipe en 1945 qui ont identifié pour la

première fois un anticorps anti-Lu^a, réagissant avec 8% d'échantillons de sang de donneurs, dans le sérum d'un sujet polytransfusé (Callender et al. 1945). L'anticorps antithétique anti-Lu^b, présent chez 99 % de la population, fut découvert en 1956 (Cutbush and Chanarin 1956).

Les antigènes Lu^a et Lu^b définissent quatre phénotypes dans la population caucasienne : Lu (a+b-), Lu (a+b+) Lu (a-b+) et Lu (a-b-) de fréquence respective 0,15 ; 7,5 et 92,35%, très rare. Les globules rouges de phénotype Lu (a-b-) (Lu null) sont dépourvus de tous les antigènes du système Luthéran à leur surface. Selon le mode de transmission du phénotype Lu (a-b-) on distingue trois phénotypes:

- **le phénotype autosomal dominant** dû à la présence du gène suppresseur *In*(Lu) (pour "Inhibiteur de Luthéran") inhibant aussi l'expression d'autres antigènes de groupes sanguins tels que P1, i, AnWj, In, Mer2 (Rao and Telen 1994). C'est le phénotype le plus courant.
- **le phénotype autosomal récessif** lié au chromosome X dû à l'hémizygotie d'un allèle suppresseur, nommé XS2 (X suppressor) (Mulley, Norman et al. 1988), qui atténue l'expression de certains antigènes comme Lu, les rendant indétectables par les techniques classiques d'agglutination et de cytométrie en flux, mais sans affecter ceux qui sont régulés par *In*(Lu). Ce phénotype est exceptionnel.
- **le phénotype autosomal récessif** qui est un vrai phénotype amorphe, noté Lu_{null} caractérisé par l'absence totale des antigènes Lu à la surface des globules rouges. Il est dû à l'homozygotie d'un allèle silencieux au locus *LU* (Myhre et al. 1975). Les individus de phénotype Lu(a-b-) produisent un seul anticorps dirigé contre un épitope différent de celui définissant les antigènes Lu^a et Lu^b. Cet anticorps, appelé anti-Lu^{ab} (Melonas et Noto 1965), est noté anti-Lu3 dans la nomenclature internationale.

B.2- Structure du gène *LU* humain

Le gène *LU* a été cloné à partir d'une banque génomique restreinte d'ADN provenant d'un individu de génotype Lu^b/Lu^b. La structure du gène *LU* a été déterminée après amplification et séquençage de fragments d'ADN chevauchants utilisant des amorces nucléotidiques choisies dans la séquence de l'ADNc. Le gène *LU* a une taille de 12,5 kb et est constitué de 15 exons dont la taille varie entre 71 et 498 pb. La caractérisation structurale du gène *LU* a permis de déterminer les bases moléculaires du polymorphisme Lu^a/Lu^b. L'analyse des séquences nucléotidiques de l'allèle Lu^a, et la comparaison avec la séquence de l'allèle Lu^b, ont mis en évidence la transition A229G dans l'Exon 3 entraînant une substitution His77Arg (El Nemer et al. 1997). Cette transition crée un site de restriction *Acil* spécifique de l'allèle Lu^b, ce qui permet de génotyper les allèles Lu^a et Lu^b.

C- Les Glycoprotéines Luthéran (gps lu)

C.1- Clonage des gps Lu/B-CAM

L'ADNc codant les gps Lu est cloné en 1995 à partir d'une banque d'ADNc de placenta humain. Cet ADNc code une protéine transmembranaire de type I de 628 a.a. La protéine appartient à la Super Famille des Immunoglobulines (SFIg) et comporte 5 domaines extracellulaires "Ig-like", un domaine

transmembranaire et un domaine intracytoplasmique de 59 a.a. (Parsons et al. 1995).

Dans une étude indépendante, Campbell et son équipe ont cloné un ADNc codant une gp de surface cellulaire appelée B-CAM (Basal Cell Adhesion Molecule), un marqueur de surface surexprimé dans certains cancers épithéliaux de l'ovaire et du colon (Campbell et al 1994). La gp B-CAM (588 a.a.) appartient à la SFIg et comporte 5 domaines extracellulaires " Ig-like ", un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique de 19 a.a.

Des travaux de notre laboratoire montrent que les gps Lu et B-CAM représentent deux isoformes codées par un gène unique *LU* (Rahuel et al. 1996). Les deux isoformes sont issues de l'épissage alternatif de l'intron 13 faisant apparaître un codon stop à la position 589 générant ainsi l'isoforme courte B-CAM tronquée des 40 a.a C-terminaux par rapport à l'isoforme longue Lu. L'isoforme B-CAM a été renommé Lu (v13) car elle résulte de la persistance de l'intron 13 dans le messager.

Notre laboratoire détermine ensuite la structure du gène *LU*. L'exon 1 code le peptide signal, les exons 2-12 codent les 5 domaines " *Immunoglobulin like* " (deux exons par domaine excepté le domaine 2 qui est codé par les exons 4-6), l'exon 13 code la région transmembranaire et la région cytoplasmique commune aux deux isoformes Lu et les exons 14 et 15 codent les 40 acides aminés spécifiques de l'isoforme la plus longue (Parsons et al. 1997).

C.2.- Structure des gps Lu/B-CAM

C.2.1- Les antigènes Lu sont portés par deux gps isoformes Lu et Lu (v13).

Les antigènes de groupe sanguin Luthéran sont sensibles à la digestion par la trypsine et la chymotrypsine (Daniels 1988; Judson et al. 1988). Les protéines Lu sont glycosylées car le traitement à l'endoglycosidase F (hydrolyse les chaînes N-glucidiques au niveau des asparagines) fait apparaître une réduction de poids moléculaire apparent (73 et 66 kDa). En conditions réductrices, il y a perte de l'antigénicité, ce qui suggère que la présence des ponts disulfures est importante pour l'intégrité des antigènes Lu (Levene et al. 1987; Parsons et al. 1987; Daniels 1988).

Les antigènes de groupe sanguin Luthéran (Lu) sont portés par deux glycoprotéines isoformes (CD239), Lu et Lu(v13) d'un poids moléculaire de 85 et 78 kDa (Parsons et al. 1995). Ces deux gps portent également l'antigène tumoral nommé B-CAM (*Basal cell adhesion molecule*) (Campbell et al 1994), antigène surexprimé dans certain tissus cancéreux (Rettig, Garin-Chesa et al. 1988).

Ces deux protéines constituées d'une région extracellulaire contenant le polymorphisme Lu^a/Lu^b, 5 sites potentiels de N-glycosylation (un site dans le domaine 3, et 4 sites dans le domaine 4), un motif **RGD** de liaison aux intégrines dans le domaine 3 et un domaine transmembranaire.

Dans les 40 a.a spécifiques de la gp Lu on trouve :

- un site potentiel de liaison aux domaines SH3 " *sarc homology 3* " (P-P-P-G-E-P) (Koch et al. 1991), suggérant que les gps Lu/B-CAM seraient impliquées dans des mécanismes de signalisation (Parsons et al. 1995).
- un motif dileucine (LL) en position 608-609, impliqué dans l'expression basolatérale de la gp Lu dans les cellules épithéliales polarisées. Ce motif est absent du domaine cytoplasmique de la gp Lu(v13) et entraîne l'expression dépolarisée de cette protéine (El Nemer et al. 1999).

- enfin, parmi les 5 sérines présentes dans le domaine cytoplasmique de la gp Lu, et grâce à l'utilisation de logiciels de prédictions de sites potentiels de phosphorylation (*Netphos*), nous avons localisé deux sites potentiels de phosphorylation, le site consensus chevauchant (L**SHSGSE**) reconnu par la Caséine Kinase II (**CKII**) et la Glycogène Synthase Kinase b (**GSK3b**) et un autre site (**RGGS****GGF**) reconnu par la Calmoduline dépendant kinase II (**CaMKII**) et la Protéine Kinase A (PKA) respectivement en position **S596**, **S598** et **S621**. Ces sites de phosphorylations pourraient moduler l'affinité des gps pour leur ligand extracellulaire, l'interaction avec le cytosquelette et être impliqués dans des processus de signalisation intracellulaire.

C.3 - Distribution tissulaire des gps Lu/B-CAM

Dans les tissus, les gps Lu/B-CAM sont exprimées à la surface des cellules érythroïdes matures et sont également exprimées dans les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires et les cellules épithéliales de nombreux tissus (Garin-Chesa et al. 1994; Parsons et al. 1995; Moulson, Li et al. 2001). Les antigènes Lu/B-CAM apparaissent à un stade tardif de l'érythropoïèse juste avant le processus d'énucléation du réticulocyte (Bony et al. 1999; Southcott et al. 1999; Daniels and Green 2000).

Leur expression est régulée dans le foie, avec un fort niveau d'expression dans les cellules épithéliales hépatiques durant le premier trimestre de développement fœtal.

Dans le rein, l'expression de la gp Lu est localisée au pôle basal des cellules épithéliales adjacentes aux membranes basales contenant la laminine a5 (glycoprotéine hétérotrimérique de la matrice extracellulaire constituée d'une chaîne a, b et g) (Moulson et al. 2001).

En culture, la gp Lu est exprimée au pôle basolatéral de cellules épithéliales polarisées grâce à son motif dileucine. La gp Lu (v13), dépourvue de ce motif, montre au contraire une expression non polarisée dans ces cellules (El Nemer et al. 1999).

C.4- Les gps Lu/B-CAM, molécules d'adhérence

Les molécules d'adhérence sont exprimées à la surface de nombreuses membranes cellulaires et assurent l'adhérence entre deux cellules ou entre une cellule et la matrice extracellulaire (membrane basale ou tissu de soutien). La sélectivité d'une molécule d'adhérence donnée repose sur sa capacité à interagir avec un nombre limité de molécules appelées ligands. Les molécules d'adhérence ont trois rôles possibles dans la cellule :

- assurer la cohésion d'un tissu, cette forme d'adhérence peut être appelée structurelle
- donner à une cellule la possibilité d'effectuer une fonction biologique déterminée, que l'on peut appeler fonctionnelle, et qui est transitoire et limitée au seul temps d'induction du processus biologique.
- La propriété fondamentale des protéines d'adhérence est de mettre en contact le milieu extracellulaire et intracellulaire :

La reconnaissance d'un ligand extracellulaire entraîne la production d'informations destinées au reste

de la cellule et susceptible de modifier la structure ou les fonctions de celle-ci. Cette propriété des protéines d'adhérence les rapproche plus des systèmes de transduction de signaux qui transforment un signal extracellulaire en un signal intracellulaire, dit “ Outside-In ” compréhensible par la cellule. L'influence des protéines d'adhérence sur le milieu intracellulaire est assurée soit par leur liaison au cytosquelette, soit par leur capacité à produire des messagers intracellulaires

D'autre part, des signaux d'activation intracellulaires modifient l'affinité des molécules d'adhérence pour leur ligands extracellulaires. Un signal activateur provenant de l'intérieur de la cellule peut entraîner un réarrangement de sa structure et ainsi amplifier son affinité pour son ligand. On parle de signalisation “ Inside-Out ” (Geissmann.F 2003).

Au cours de ces dix dernières années il a été montré que les molécules d'adhérence sont impliquées dans de multiples processus de transduction de signal (Juliano 2002).

Les quatre principales familles des molécules d'adhérence sont :

- les cadhérines,
- **la superfamille des immunoglobulines,**
- les intégrines,
- les sélectines,

C.4.1- Les molécules d'adhérence dans les érythrocytes.

Les molécules d'adhérence présentes à la surface des érythrocytes regroupent les antigènes Scianna (SC) et Radin (rd) portés par la protéine ERMAP, LW portés par la protéine ICAM-4, Indian (IN) portés par le CD44 récepteur de l'acide hyaluronique, Lu portés par les gps Lu, Ok portés par la protéine CD147. La plupart de ces protéines appartient à la superfamille des immunoglobulines, possède un ou plusieurs domaines “ *Ig-like* ” et est responsable des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire (MEC). Ces molécules d'adhérence sont présentes à la surface des réticulocytes et des globules rouges matures humains. Elles leur permettraient d'adhérer à de nombreux ligands incluant la thrombospondine, la fibronectine, les acides hyaluroniques, la laminine et à des cellules endothéliales et des leucocytes.

C.4.2- Les molécules d'adhérence dans les cellules mésangiales glomérulaires.

Le développement définitif du rein implique entre autre la conversion du mésenchyme en épithélium. Cet épithélium subit une suite de modifications morphologiques qui ont pour résultat la formation du néphron, unité de filtration formée du glomérule et des tubules. Les cellules mésangiales sont des cellules épithéliales présentes dans le glomérule. Elle expriment plusieurs molécules d'adhérence de type intégrine b1 (a1b1, a2b1, a3b1, a5b1, a6b1 et a8b1) ainsi que la gp Lu. En association avec des cellules endothéliales, elles participent au maintien de la configuration en boucle des capillaires du glomérule (Gauer 1997).

Des expériences d'immunohistochimie chez la souris ont montré que la gp Lu est exprimée en association avec l'intégrine b1 et semblerait avoir un rôle fondamental dans le développement embryonnaire et dans la morphogenèse du rein(Kikkawa et al. 2003). L'inactivation spécifique du gène murin codant la chaîne a5 de la laminine entraîne des dommages importants des membranes basales et montre un rôle fondamental de cette isoforme dans le développement embryonnaire et

notamment dans la morphogenèse du rein (Kikkawa et al. 2003). Les gps Lu et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ sont les deux récepteurs de cette isoforme dans les cellules mésangiales et coopèrent *in vitro* pour médier l'adhérence de ces cellules sur la chaîne $\alpha 5$ de la laminine dans le rein. En effet, l'inactivation du gène murin codant pour l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, entraîne chez les souris un phénotype qui ressemble à celui observé chez les souris laminine $\alpha 5^{-/-}$ mais avec des effets moins sévères, ce qui suggère une coopération *in vivo* entre les récepteurs et $\alpha 3\beta 1$.

C.5- Les gps Lu/B-CAM récepteurs spécifiques de la laminine 10/11.

Les laminines sont des glycoprotéines extracellulaires présentes dans toutes les membranes basales. Ce sont des hétérodimères composés de trois chaînes génétiquement distinctes α, β, γ (Engel et al. 1981; Bruch et al. 1989). Il existe 15 isoformes de laminines dérivant de la combinaison des 5 chaînes α , 3 chaînes β et 3 chaînes γ .

La gp Lu fixe la laminine (El Nemer et al. 1998; Udani et al. 1998) mais pas la fibronectine, la vitronectine, la transferrine, le fibrinogène ou la fibrine. L'absence de liaison à la laminine des globules rouges de phénotype Lu ($\alpha\beta$ -) de type *In*(Lu) (réduction sévère de l'expression de CD44) et des globules rouges de phénotype ($\alpha\beta$ -) de type XS2 (expression normale de CD44) indique que le CD44, qui est associé à l'expression des gps Lu/B-CAM, ne participe pas à la liaison à la laminine (Udani et al. 1998). Les deux isoformes Lu ont la même capacité de fixation à la laminine (El Nemer et al. 1998; Zen et al. 1999). Les cellules érythroleucémiques murines K562 exprimant les gps Lu recombinantes adhèrent à la laminine soluble dans des conditions d'adhérence dynamiques et statiques (El Nemer et al. 1998; Udani et al. 1998; Parsons et al. 2001). Les globules rouges Lu positifs mais pas les Lu_{null} fixent spécifiquement la laminine 10/11 ($\alpha 5\beta 1/\beta 2\gamma 1$), isoforme contenant la chaîne $\alpha 5$ (Parsons et al. 2001). Il y a un effet totalement inhibiteur de la molécule soluble Fc-Lu sur la fixation de globules rouges sur la laminine (conditions d'adhérence dynamiques). Ces résultats indiquent que les gps Lu/B-CAM seraient les récepteurs uniques de la laminine sur le globule rouge (El Nemer et al. 1998). De récentes investigations par des techniques d'interactions protéines-protéines (Biacore) indiquent que les domaines extracellulaires recombinants de la gp Lu fixent la laminine avec une haute affinité : K_D de 10,8nM (Southcott et al 1997).

La fixation à la laminine des précurseurs érythroïdes est corrélée à l'apparition tardive des gps Lu dans l'érythropoïèse (El Nemer et al 1998.) L'hypothèse a été émise que les gps Lu/B-CAM pourraient jouer un rôle dans la migration des érythrocytes matures de la moelle osseuse vers le sang périphérique (Parsons et al 1995). Les gps Lu/B-CAM pourraient aussi avoir un rôle dans la migration des progéniteurs du foie fœtal vers la moelle osseuse (Parsons et al. 1995).

La drépanocytose est une maladie génétique dont la base moléculaire est une substitution Glu6Val dans l'hémoglobine β . Cette mutation provoque la polymérisation de la déoxyhémoglobine S et la formation de longs cristaux qui déforment la membrane érythrocytaire. L'anémie hémolytique chronique et la vaso-occlusion sont les deux signes cliniques majeurs de cette maladie (pour revues voir Hebbel, 1991, et Hillery, 1998). Les globules rouges drépanocytaires (SS) présentent une surexpression des antigènes Lu corrélée à une liaison augmentée à la laminine 10/11 ce qui contribuerait à leur adhérence renforcée à la matrice subendothéliale et aux phénomènes de vaso-

occlusion observés chez les patients drépanocytaires (El Nemer et al. 1999).

C.5.1- Site de fixation aux gps Lu/B-CAM

La cartographie du domaine d'interaction des gp Lu et Lu(v13) avec la laminine a été effectuée en utilisant des protéines solubles (Fc-Lu), présentant différentes combinaisons des cinq domaines “ Ig-like ” extracellulaires des gp Lu. Ce sont des protéines chimères comprenant le peptide Fc de l'immunoglobuline (25 kDa) qui permet leur élution du milieu de culture après transfection et production par les cellules COS-7. Ces études ont montré qu'il existe peut-être deux sites de fixation à la laminine sur les gps Lu. Zen et al (1999) ont montré qu'un site de fixation se situe sur le domaine “ Ig-like ” 5 de la gp Lu. Notre équipe a ensuite montré que la fixation est médiée par les domaines 1-2-3 de la gp Lu humaine. Un réarrangement spatial spécifique de ces trois domaines est probablement nécessaire pour l'interaction avec la laminine (El Nemer et al. 2001; Parsons et al. 2001).

C.5.2- Site de fixation au niveau de la laminine

La chaîne α de la laminine possède au niveau de son domaine C-terminal un large domaine globulaire (G) constitué de cinq modules de type LG arrangés en tandem (LG1 à LG5) qui contiennent des sites de fixation pour les intégrines β 1 et l'héparine (Timpl 2000).

Le site de fixation de la gp Lu sur la laminine α 5 *in vivo* se situe dans le module α 5 LG3 (Kikkawa et al. 2002).

C.6- Gps Lu et voies de signalisation.

Un article récent du groupe de M. Telen fait état du rôle activateur de la voie AMP cyclique dépendante de la Protéine Kinase A (PKA), dans l'adhérence renforcée des globules rouges drépanocytaires à la laminine, via les gps Lu (Hines et al. 2003). La stimulation de l'adhésion par l'AMPc et la PKA était inattendue car la PKA était largement décrite comme régulateur négatif de l'adhésion dans de nombreux types cellulaires. Il s'agit d'un des premiers exemples de transduction de signal dans les globules rouges médié par des molécules d'adhérence. Toutefois une voie spécifique entre l'activation de la PKA et la stimulation de l'adhésion par les gps Lu reste à démontrer. Au laboratoire nous avons récemment montré dans des cellules érythroïdes et épithéliales, que l'isoforme Lu est phosphorylée par la PKA (résultats non publiés).

C.7- Interaction des gps Lu/B-CAM avec le squelette érythrocytaire

L'interaction des gps Lu avec le cytosquelette a été démontré par plusieurs techniques.

La technique de FIMD (Fluorescence Imaged Micro Deformation) qui permet de réaliser des études biophysiques de microdéformabilité de globules rouges marqués par des anticorps anti-Lu fluorescents (Parsons et al. 2001).

La technique de cytométrie en flux qui consiste à mettre en évidence la liaison des gps Lu/B-CAM au squelette érythrocytaire à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiques des antigènes membranaires avant et après solubilisation de la membrane par le détergent Triton X100 (Gane, P et al. 2001).

La technique de capture de GST “ GST-pull-down ” qui consiste à greffer sur de la résine

gluthation l'extrémité C-terminale de la gp Lu fusionnée à la protéine GST, et à la mettre en présence d'un lysat de membrane de globules rouges. (Kroviarski et al. 2004).

Le système Biacore ou technique d'interaction protéines-protéines en temps réel qui consiste à détecter des interactions biospécifiques entre deux composants. L'analyse consiste à immobiliser l'un des deux composants à tester (le ligand) sur une matrice microfluidique et à faire passer l'autre composant (analyte) au contact de cette surface à l'aide d'un flux microfluidique.

D- Objectifs du travail.

Les gps Lu/B-CAM ont été bien étudiées au niveau de leur capacité à lier la laminine 10/11 par leurs domaines extracellulaires. Mais le rôle du domaine cytoplasmique reste encore à définir.

Nous avons montré que les gps Lu sont liées au squelette érythrocytaire (Gane et al. 2001) et nous avons montré que cette interaction est médiée par la spectrine (Kroviarski et al. 2004).

Le but de ce travail a été de rechercher d'autres partenaires cytoplasmiques des gps Lu pouvant être impliqués non seulement dans l'interaction avec le cytosquelette mais également dans la transduction de signal. Pour cela et en collaboration avec le Dr MC Lecomte (U459, Hôpital Xavier Bichat) nous avons utilisé la technique du double-hybride dans la levure à partir d'une banque d'ADNc de rein humain (Nicolas et al 2002).

Lorsque j'ai intégré cette thématique, le crible était réalisé par un étudiant en fin de thèse. Mon travail a commencé par l'isolement et la caractérisation des différentes protéines potentiellement partenaires des protéines Lu, dont une fait l'objet de ce mémoire, la protéine Ubc9 (Ubiquitin-enzyme conjugated 9).

Cette enzyme, dont la fonction est peu connue chez les mammifères, est impliquée dans la conjugaison de SUMO-1 (small ubiquitin related modifier) sur des protéines cibles. La sumoylation, à la différence de l'ubiquitinylation (considérée comme une des premières étapes qui mènent à la dégradation) semble fonctionner comme antagoniste de l'ubiquitine en protégeant les protéines de la dégradation. De plus, la sumoylation jouerait également un rôle dans la localisation subcellulaire des protéines.

Nous avons confirmé la spécificité de cette interaction 1) *in vitro* par la technique du double hybride, et par une technique de capture de GST " GST-pull-down " 2) dans un système cellulaire par une technique de coimmunoprécipitation.

Grâce à l'utilisation de mutants, nous avons cartographié le site de fixation de ce partenaire au sein du domaine cytoplasmique de la gp Lu.

Nous avons ensuite étudié par microscopie confocale, l'effet de mutation du site d'interaction sur la localisation et le routage des gps Lu.

V- BIBLIOGRAPHIE

-A-

al-Khodairy et al. (1995). "The Schizosaccharomyces pombe hus5 gene encodes a ubiquitin conjugating enzyme required for normal mitosis." *J Cell Sci* **108** (Pt 2): 475-86.

-B-

Bartel, P. et al. (1993). "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system." *Biotechniques* **14**(6): 920-4.

Bies, J. et al. (2002). "Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity." *J Biol Chem* **277**(11): 8999-9009.

Bolcato-Bellemin et al. (2003). "Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development." *Dev Biol* **260**(2): 376-90.

Bony, V et al. (1999). "Time-course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation." *Br J Haematol* **107**(2): 263-74.

Bruch, M et al. (1989). "Dissection of laminin by cathepsin G into its long-arm and short-arm structures and localization of regions involved in calcium dependent stabilization and self-association." *Eur J Biochem* **185**(2): 271-9.

-C-

Callender, S. T. et al. (1945). "Hypersensitivity to transfused blood." *Br Med J* **ii**: 8.

Camara-Clayette, V. et al. (2001). "Transcriptional regulation of the KEL gene and Kell protein expression in erythroid and non-erythroid cells." *Biochem J* **356**(Pt 1): 171-80.

Camonis, J. and F. Moreau-Gachelin (1997). "Protéines cherche protéine: mode d'emploi." *Hématologie* **3**: 540-549.

Campbell, I. G. et al. (1994). "Molecular cloning of the B-CAM cell surface glycoprotein of epithelial cancers: a novel member of the immunoglobulin superfamily." *Cancer Res* **54**(22): 5761-5.

Cartron, J. P. et al. (1998). "Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens." *Vox Sang* **74 Suppl 2**: 29-64.

Cartron, J. P. and Y. Colin (2001). "Structural and functional diversity of blood group antigens." *Transfus Clin Biol* **8**(3): 163-99.

Cutbush, M. and I. Chanarin (1956). "The expected blood-group antibody, anti-Lub." *Nature* **178**: 855-856.

-D-

Daniels, G. (1988). "Lutheran related antibodies." *Rev Fr Transfus Immunohematol* **31**(2): 447-52.

Daniels, G. (1997). "Blood group polymorphisms: molecular approach and biological significance." *Transfus Clin Biol* **4**(4): 383-90.

Daniels, G. and C. Green (2000). "Expression of red cell surface antigens during erythropoiesis." *Vox Sang* **78 Suppl 2**: 149-53.

Daniels, G. L. et al. (2003). "International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red cell surface antigens: Vancouver Report." *Vox Sang* **84**(3): 244-7.

Desterro, J. M. et al. (1999). "Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1." *J Biol Chem* **274**(15): 10618-24.

Desterro, J. M. et al. (1997). "Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin." *FEBS Lett* **417**(3): 297-300.

-E-

Ebina, Y. et al. (1983). "LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene." *J Biol Chem* **258**(21): 13258-61.

El Nemer, W. et al. (1999). "Isoforms of the Lutheran/basal cell adhesion molecule glycoprotein are differentially delivered in polarized epithelial cells. Mapping of the basolateral sorting signal to a cytoplasmic di-leucine motif." *J Biol Chem* **274**(45): 31903-8.

El Nemer, W. et al. (1998). "The Lutheran blood group glycoproteins, the erythroid receptors for laminin, are adhesion molecules." *J Biol Chem* **273**(27): 16686-93.

El Nemer, W. et al. (2001). "Characterization of the laminin binding domains of the Lutheran blood group glycoprotein." *J Biol Chem* **276**(26): 23757-62.

El Nemer, W. et al. (1997). "Organization of the human LU gene and molecular basis of the Lu(a)/Lu(b) blood group polymorphism." *Blood* **89**(12): 4608-16.

Engel, J. et al. (1981). "Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix." *J Mol Biol* **150**(1): 97-120.

-F-

Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* **340**(6230): 245-6.

Firestein, R. and N. Feuerstein (1998). "Association of activating transcription factor 2 (ATF2) with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. Implication of the ubiquitin/proteasome pathway in regulation of ATF2 in T cells." *J Biol Chem* **273**(10): 5892-902.

-G-

Gane, P., C et al. (2001). "Flow cytometric analysis of the association between blood group-related proteins and the detergent-insoluble material of K562 cells and erythroid precursors." *Br J Haematol* **113**(3): 680-8.

Garin-Chesa, P. et al. (1994). "Non-polarized expression of basal cell adhesion molecule B-CAM in epithelial ovarian cancers." *Int J Oncol* **5**: 1261-1266.

-

Gauer, S. et al. (1997). "Adhesion molecules in the glomerular mesangium." *Kidney Int* **51**(5): 1447-53.

Geissmann.F (2003). "ADHERENCE ET MOBILITE CELLULAIRE "COURS 2".

Giorgino, F. et al. (2000). "The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1125-30.

-H-

Hateboer, G. et al. (1996). "mUBC9, a novel adenovirus E1A-interacting protein that complements a yeast cell cycle defect." *J Biol Chem* **271**(42): 25906-11.

Hebbel, R. P. (1991). Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*, **77**, 214-37.

Hillery, C. A. (1998). Potential therapeutic approaches for the treatment of vaso-occlusion in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*, **5**, 151-5.

Hines, P. C. et al. (2003). "Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of B-CAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion." *Blood* **101**(8): 3281-7.

Huang, X. (1992). "A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps." *Genomics* **14**(1): 18-25.

-I-

Ivanova, A. V., S. V. Ivanov, et al. (2001). "Regulation of STRA13 by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, hypoxia, and the UBC9/ubiquitin proteasome degradation pathway." *J Biol Chem* **276**(18): 15306-15.

-J-

Judson, P. A. et al. (1988). "Report on group 8 (Lutheran) antibodies." *Rev Fr Transfus Immunohematol* **31**(2): 433-40.

Juliano, R. L. (2002). "Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 283-323.

-K-

Kikkawa, Y. et al. (2002). "Identification of the binding site for the Lutheran blood group glycoprotein on laminin alpha 5 through expression of chimeric laminin chains in vivo." *J Biol Chem*.

Kikkawa, Y., et al. (2003). "Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin alpha5 in the glomerular basement membrane." *J Cell Biol* **161**(1): 187-96.

Koch, C. A. et al. (1991). "SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins." *Science* **252**(5006): 668-74.

Kroviarski, Y. et al. (2004). "Direct interaction between the Lu/B-CAM adhesion glycoproteins and erythroid spectrin." *Br J Haematol* **126**(2): 255-64.

-L-

Levene, C., Y. Karniel, et al. (1987). "2-Aminoethylisothiuronium bromide-treated red cells and the Lutheran antigens Lua and Lub [letter]." *Transfusion* **27**(6): 505-6.

-M-

Melchior, F. (2000). "SUMO--nonclassical ubiquitin." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 591-626.

Melonas, K. et Noto, T. A. (1965). Anti-LuaLub imitating a panagglutinin. *Transfusion*, **5**, 370.

Moulson, C. L. et al. (2001). "Localization of Lutheran, a novel laminin receptor, in normal, knockout, and transgenic mice suggests an interaction with laminin alpha5 in vivo." *Dev Dyn* **222**(1): 101-14.

Mudad, R. and M. J. Telen (1996). "Biologic functions of blood group antigens." *Curr Opin Hematol* **3**(6): 473-9.

Muller, S. et al. (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-10.

Mulley, J. C. et al. (1988). "A regional localisation for X-linked suppressor gene (XS) for the Lutheran blood group." *Hum Genet* **78**: 127-9.

Myhre, B. et al. (1975). "A further example of the recessive Lu(a-b-) phenotype." *Vox Sang* **29**(1): 66-8.

-P-

Palek, J. and S. Lambert (1990). "Genetics of the red cell membrane skeleton." *Semin Hematol* **27**(4): 290-332.

Parsons, S. F. et al. (2001). "Lutheran blood group glycoprotein and its newly characterized mouse homologue specifically bind alpha5 chain-containing human laminin with high affinity." *Blood* **97**(1): 312-20.

Parsons, S. F. et al. (1997). "Use of domain-deletion mutants to locate Lutheran blood group antigens to each of the five immunoglobulin superfamily domains of the Lutheran glycoprotein: elucidation of the molecular basis of the Lu(a)/Lu(b) and the Au(a)/Au(b) polymorphisms." *Blood* **89**(11): 4219-25.

Parsons, S. F. et al. (1995). "The Lutheran blood group glycoprotein, another member of the immunoglobulin superfamily, is widely expressed in human tissues and is developmentally regulated in human liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5496-500.

Parsons, S. F. et al. (1987). "Evidence that the Lub blood group antigen is located on red cell membrane glycoproteins of 85 and 78 kd." *Transfusion* **27**(1): 61-3.

-

Poukka, H. et al. (1999). "Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription." *J Biol Chem* **274**(27): 19441-6.

-R-

Rahuel, C. et al. (1996). "A unique gene encodes spliceoforms of the B-cell adhesion molecule cell surface glycoprotein of epithelial cancer and of the Lutheran blood group glycoprotein." *Blood* **88**(5): 1865-72.

Rao, N. and M. Telen (1994). Lutheran antigens, Lutheran regulatory genes, and Lutheran regulatory gene targets. *Blood Cell Biochemistry*. J. P. Cartron and P. Rouger. New York, Plenum Press. **6**: 267-297.

Rettig, W. J. et al. (1988). "Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(9): 3110-4.

Rodriguez, M. S. et al. (1999). "SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53." *Embo J* **18**(22): 6455-61.

Rodriguez, M. S. et al. (2001). "SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting." *J Biol Chem* **276**(16): 12654-9.

Russo, D. et al. (2000). "Expression of Kell blood group protein in nonerythroid tissues." *Blood* **96**(1): 340-6.

-S-

Saiki, R. K. (1985). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymérase." *Science* **239**: 487-491.

Saitoh, H. et al. (2002). "Perturbation of SUMOlation enzyme Ubc9 by distinct domain within nucleoporin RanBP2/Nup358." *J Biol Chem* **277**(7): 4755-63.

Sanger, F. (1981). "Determination of nucléotide sequences in DNA." *Science* **214**: 1205-1210.

Seeler, J. S. et al. (2001). "Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification." *Mol Cell Biol* **21**(10): 3314-24.

Seufert, W. et al. (1995). "Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins." *Nature* **373**(6509): 78-81.

Southcott, M. J. et al. (1999). "The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system." *Blood* **93**(12): 4425-35.

-T-

Timpl, R. (2000). "Structure and function of lamini LG modules." *Matrix Biol Aout* **19** (4): 309-17.

Tong, H. et al. (1997). "Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system." *J Biol Chem* **272**(34): 21381-7.

Tsytsykova, A. V. et al. (1998). "The mouse genome contains two expressed intronless retroposed pseudogenes for the sentrin/sumo-1/PIC1 conjugating enzyme Ubc9." *Mol Immunol* **35**(16): 1057-67.

-U-

Udani, M. et al. (1998). "Basal cell adhesion molecule/lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin." *J Clin Invest* **101**(11): 2550-8.

UK, L. (1970). "cleavage of structural protéins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.

-V-

Vojtek, A. B. et al. (1993). "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf." *Cell* **74**(1): 205-14.

-W-

Wilson, V. G. and D. Rangasamy (2001). "Intracellular targeting of proteins by sumoylation." *Exp Cell Res* **271**(1): 57-65.

-X-

Xu, W. et al. (2000). "Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9." *Exp Cell Res* **255**(2): 135-43.

-Y-

Yeh, E. T. et al. (2000). "Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles." *Gene* **248**(1-2): 1-14.

Yonemura, S. et al. (1998). "Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2." *J Cell Biol* **140**(4): 885-95.